

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 3 月 21 日 (21.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/22788 A1

(51) 国際特許分類: **C12N 5/06, 5/02 // (C12N 5/06, C12R 1:91) (C12N 5/02, C12R 1:91)**

(74) 代理人: 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyoshi et al.); 〒102-0083 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07914

(22) 国際公開日: 2001 年 9 月 12 日 (12.09.2001)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-276971 2000 年 9 月 12 日 (12.09.2000) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 加藤幸夫 (KATO, Yukio) [JP/JP]; 〒732-0062 広島県広島市東区牛田早稲田3丁目6番9号 501 Hiroshima (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 堤 真一 (TSUTSUMI, Shinichi) [JP/JP]; 〒734-0023 広島県広島市南区東雲本町1丁目16番5号 601 Hiroshima (JP). 島津 篤 (SHIMAZU, Atsushi) [JP/JP]; 〒732-0062 広島県広島市東区牛田早稲田3丁目6番9号 105 Hiroshima (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CULTURING MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) 発明の名称: 間葉系幹細胞の培養方法

(57) Abstract: A novel method of culturing mesenchymal stem cells whereby a remarkably larger number of mesenchymal stem cells can be obtained compared with the conventional culture methods. This culture method is characterized by adding to a medium a fibroblast growth factor (FGF) as a substance which stimulates the proliferation potency of the mesenchymal stem cells while maintaining the pluripotency thereof and prolongs the life. According to this method, mesenchymal stem cells can be cultured at least over 30 generations and, moreover, about 10^5 to 10^6 times as much cell count as in the conventional culture methods can be obtained.

(57) 要約:

本発明は、従来の培養方法と比較して顕著に多くの間葉系幹細胞を得ることができる、新規な間葉系幹細胞の培養方法を提供する。当該培養方法は、間葉系幹細胞の多分化能を維持しながらその増殖能を刺激し、さらに寿命を延長させる物質として、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) を培地に添加することを特徴とし、間葉系幹細胞を 30 世代以上培養しうるばかりでなく、従来の培養法と比較して細胞数にして約 $10^5 \sim 10^6$ 倍の細胞数を得ることができる。



WO 02/22788 A1

明 細 書

間葉系幹細胞の培養方法

技術分野

- 5 本発明は、新規な間葉系幹細胞の培養方法およびかかる方法により得られた多分化能を有する間葉系幹細胞に関する。なお、本発明において、間葉系幹細胞は少なくとも軟骨細胞または骨芽細胞への分化能を有する未分化間葉系細胞（間充織幹細胞）を意味する。

背景技術

- 10 脊椎動物、特に哺乳動物の組織は、細胞再生系、例えば傷害もしくは疾患、または加齢による細胞・組織の損失に対する再生系において、細胞・組織の再生能を有する幹細胞を含んでいる。故に、幹細胞は当該組織内または幹細胞の貯蔵場所として働く別の組織内において見出される。幹細胞の貯蔵場所の主要な例として骨髄および骨膜を挙げることができる。

- 15 骨髄は成体の造血幹細胞の主要な供給源であり、該造血幹細胞は多能性を有する未分化な細胞であり、全ての血液細胞（例えば、赤血球、白血球、リンパ球など）は該造血幹細胞から分化することが知られている。造血幹細胞の培養・分化については多くの研究がなされており、造血幹細胞の培養、各々の血液細胞（成分）への分化・誘導に有用な多くの物質（増殖因子）が知られている。

- 20 一方、骨髄や骨膜等には、造血幹細胞とは別の幹細胞、即ち間充織幹細胞が含まれ、これらは、骨、軟骨、筋肉、靱帯、腱、脂肪および間質などの間充織組織系の再生に有用な役割を果たしている。間葉系幹細胞（間充織幹細胞）は、未分化な細胞として増殖し、そして例えば脂肪細胞、軟骨細胞または骨芽細胞などに分化しうる多能性を保持している。該幹細胞は、成体の骨髄および骨膜から容易に単離することができ、幹細胞として安定な表現型・細胞形態を示す。例えば
- 25 骨髄由来の間葉系幹細胞はインビトロ培養では単層の性質を保持している（Pittenger M. F. ら, *Science* 284, 143-147, 1999 年）。

このため、間葉系幹細胞を大量に培養して、得られた未分化細胞から軟骨組織または骨組織などを分化誘導し、これらを移植治療に用いることが提案された。その第1段階として骨髓由来の間葉系幹細胞の培養が試みられた。しかしながら、従来の培養方法では、15世代前後で該幹細胞の増殖が停止するかまたは極度に遅くなるため、十分な数の間葉系幹細胞を得ることができないという問題がある。さらには軟骨細胞または骨芽細胞への分化能が消失してしまうという問題も生じている。間葉系幹細胞から軟骨または骨組織を誘導してこれらを移植治療に用いるためには、出発材料として該幹細胞が多数必要である。

10 発明の開示

本発明は、従来の培養方法と比較して顕著に多くの間葉系幹細胞を得ることができる新規な間葉系幹細胞の培養方法を提供することを目的とする。

本発明はまた、かかる方法により得られた多能性を有する間葉系幹細胞を提供することを目的とする。

15 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、繊維芽細胞増殖因子（FGF）を含有する培地中において間葉系幹細胞を培養すると、25世代以上の継代培養が可能であることを見出し、本発明を完成させた。

従って、本発明は、間葉系幹細胞の増殖能を刺激する物質を培地に添加することを特徴とする、哺乳動物の間葉系幹細胞の培養方法を提供する。当該培養方法
20 において、間葉系幹細胞の増殖能を刺激する物質としてFGFが有用である。培地中のFGFの濃度は、通常は0.01～100ng/mlであり、好ましくは0.04～10ng/ml、さらに好ましくは0.1～1ng/mlである。

本発明の方法において、FGFは、哺乳動物の間葉系幹細胞の増殖能を刺激する能力を有するものであれば、その由来には関係なく使用することができるが、
25 哺乳動物由来のFGF、例えばFGF-1（aFGF）またはFGF-2（bFGF）が好ましい。bFGFではヒト由来、ウシ由来のbFGFは市販されており、容易に入手可能である。また、哺乳動物由来の他のFGFも受容体が共通であることから、本発明において使用可能である。

b F G Fをはじめとする種々の F G F は、他の増殖因子と同様に様々な細胞の培養に用いられており、例えば造血幹細胞（特開平 1 1 - 1 0 3 8 5 6 号公報）、軟骨細胞（Y. Kato & D. Gospodarowicz, *J. Cell Biol.*, vol 100, 477-485, 1985 年）に用いられている。しかし、F G F が骨髄・骨膜由来の間葉系幹細胞
5 多分化能の維持、インビトロでの寿命（Life Span）の延長および増殖回数の増加に顕著な効果を有することは知られていない。

間葉系幹細胞

本発明において、間葉系幹細胞は骨髄および／または骨膜由来であり、且つ間
10 充織組織系の組織、例えば脂肪組織、軟骨組織または骨組織に分化しうる多能性を有する未分化な細胞である。間葉系幹細胞は、該細胞を有する任意の骨髄または骨膜から採取することができるが、多量の細胞が採取可能であること及び採取が容易であることから、大腿骨、脛骨および骨盤（腸骨）から採取するのが好ましい。ヒト以外の哺乳動物については、腸骨および脛骨などからも間葉系幹細胞
15 を採取することができる。

骨髄由来の間葉系幹細胞の採取方法としては、公知の方法、例えば医療において用いられている任意の採取方法を用いることができる。ヒト以外の哺乳動物の骨髄から該幹細胞を採取する際には、実験室的方法として例えば骨（大腿骨、脛骨）の両端を切断し、間葉系幹細胞の培養に適する培地で骨内を洗浄して、洗い
20 出された該培養液から間葉系幹細胞を得ることができる。具体的には、下記のように採取する：

（1）ウサギの大腿骨、脛骨の両端を切断する。次いで、培地（例えばDMEM培地）、所望する場合には抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシンなど）およびヘパリンをさらに添加した培地で骨髄内を洗浄する。

25 ヒト腸骨の場合は、該腸骨の骨髄から骨髄液を採取する。

（2）洗い出された培地を 3 0 0 × g、3 分程度遠心分離して、沈殿した骨髄細胞を回収する。得られた細胞を適当な培地（例えば 1 0 % F B S 含有 DMEM 培地）で適当な濃度に希釈して細胞培養皿に播種する。3 日間培養して、培養皿に

接着した細胞を骨髄由来の間葉系幹細胞とする。

また、骨膜から該幹細胞を採取するには、公知の方法を用いることができる
[M. Iwasaki et al., *Endocrinology* 132, 1603-1608 (1993); J. Fang & B.K.
Hall, *Developmental Biol.* 180, 701-712 (1996); S. Bahrami et al., *The*
5 *anatomical Record* 259, 124-130 (2000)]。例えば下記の方法により得ることが
できる：

(1) ウサギの大腿骨、脛骨において結合組織などの軟部組織等を剥離し、骨膜
を露出させ、次いで適当な大きさに切除して採取する。採取した骨膜を細かく切
り刻んだ後、37℃にてコラゲナーゼで処理する。

10 (2) 次いで、例えばピペッティング等により細胞を遊離させ、濾過または遠心
分離によって細胞を収集する。得られた細胞を計測し、適当な培地（例えば1
0% FBS含有DMEM培地）で適当な濃度に希釈して、細胞培養皿に播種する。
3日間培養して、培養皿に接着した細胞を骨膜由来の間葉系幹細胞とする。

このような方法により、 $10^4 \sim 10^5$ 細胞個程度の間葉系幹細胞を得ることが
15 できる。単離された間葉系幹細胞は、そのまま播種して培養に供することができ
るが、通常は適当な培地中にて10～20日程度培養してから使用する。また、
該細胞を凍結保存することもできる。

間葉系幹細胞の培養方法

20 上述のようにして得られた幹細胞は、該細胞の培養に適する任意の培地にbFGF
を0.01～100ng/ml、好ましくは0.04～10ng/ml、さらに好まし
くは0.1～1ng/ml、例えば1ng/mlの濃度で添加して培養する。培養は、哺
乳動物の細胞の培養に適する任意の条件で実施することができるが、一般的には
37℃にて5%CO₂存在下で行うのが好ましく、例えば下記のように培養する
25 ことができる：

(3) 上述のように培養皿に接着した間葉系幹細胞を、適当な培地（例えば1
0% FBS含有DMEM培地）で、37℃にて5%CO₂存在下で培養する。

(4) 培地は3日に1回交換する。bFGFは例えば5日目より1ng/mlで培

地に添加する。

また、幹細胞の継代培養は、当該細胞培養の分野において公知の適する方法で行うことができる。例えば、集密的（c o n f l u e n t）に近くなった初代培養のプレートから細胞を収集し、それを適当なb F G F含有培地に播種し、初代培養と同様な条件下で培養し、そして細胞が集密的になる前に継代して培養する。5 具体的には、下記のように継代培養する：

（５）上記（４）の初代培養が１０日前後で集密的に近くなる。このプレートをトリプシン（例えば０．０５％）＋ＥＤＴＡ（例えば０．２ｍＭ）で処理して細胞をプレートから回収し、得られた細胞数を計測する。

10 （６）培養した幹細胞を、 5×10^3 細胞個／ cm^2 の密度でb F G F（１ng／ml）を含有する培地に播種して培養し、細胞が集密的になる前に継代する。

（７）上記（６）の操作を繰り返し、継代培養を実施する。

本発明の培養方法では、間葉系幹細胞の増殖が１５世代、好ましくは２５世代、さらに好ましくは３０世代を越えても、または継代培養期間１６日以上、好ましくは２０日以上、より好ましくは３０日以上、さらに好ましくは４０日、最も好ましくは５０日以上においても停止することなく、非常の多くの幹細胞を得ることができる。また、培養された該幹細胞は間充織系の種々の組織、例えば軟骨組織または骨組織に分化させることができる。

20 培養した間葉系幹細胞から軟骨細胞（組織）を得るためには、該幹細胞をトリプシン処理し、次いで遠心分離などにより単離した後、浮遊培養系、アガロース培養系またはアルギン酸培養系に移して、軟骨分化誘導に適する培地、例えば M. F. Pittenger ら、*Science* 284, 143-147, 1999 年に記載の培地を用いて軟骨細胞を誘導することができる。

25 また、間葉系幹細胞から骨細胞（組織）を得るためには、該幹細胞をトリプシン処理し、次いで遠心分離などにより単離した後、骨分化誘導に適する培地、例えば前記 M. F. Pittenger らに記載の培地を用いて骨細胞を誘導することができる。

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの

実施例に制限されることはない。

発明を実施するための最良の形態

実施例

5 実施例 1 間葉系幹細胞の培養

1) 間葉系幹細胞の採取

1-1) 骨髓からの幹細胞の採取

4週齢ウサギの大腿骨、脛骨から筋肉および靱帯などを除いてこれを切除し、その両端を切断する。次いで、DMEM培地（32単位/ml ペニシリン、50
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、および6000単位/ml ヘパリンを含有）で骨髓内を洗浄した。洗い出された培地を遠心分離（300×g，3分間）して、沈殿した骨髓細胞を10%FBS含有DMEM培地で希釈した後、 2×10^8 細胞個（赤血球を含む）/10cm 培養皿にて播種した。細胞は37℃にて5%CO₂存在下で3日間培養して、接着した細胞（約2000細胞個/培養皿）を骨
15 髄由来の間葉系幹細胞とした。

1-2) 骨膜からの幹細胞の採取

4週齢ウサギの大腿骨、脛骨において結合組織などの軟部組織等を剥離し、骨膜を露出させ、約5×5ミリの大きさを骨膜を切除して採取する。骨膜に付着する軟部組織を除去した後、細かく切り刻み、これを37℃で120分間、0.1%コラゲナーゼで処理した。次いで、ピペッティングにより細胞を遊離させ、これを濾過することによって細胞を採取し、PBSにて3回洗浄する。細胞を1
20 0%FBS含有DMEM培地で希釈して細胞数を計測し、 2×10^5 細胞個/10cm 培養皿にて播種した。細胞は3日間培養して、接着した細胞を骨膜由来の間葉系幹細胞とした。

25 2) 間葉系幹細胞の培養

骨髓から採取した間葉系幹細胞を10%FBS含有DMEM培地で培養して、3日に1回培地を交換した。bFGFは骨膜由来の細胞については2日目から、骨髓由来の細胞については5日目から1ng/mlで培地に添加し、対照群には何

も添加しなかった。両群ともに10日前後でほぼ集密的になった。これらのプレートを0.05%トリプシン+0.2mM EDTAで5分間処理し、増殖した幹細胞を単離した。細胞数をCoulterカウンター（Z1シングル，コールター社製）で計測し、そして5000細胞個/cm²の密度で細胞を播種した。bFGFは継代培養においても1ng/mlの濃度で添加した。bFGF添加群および対照群における間葉系幹細胞の培養の結果を図1（細胞数/培養日数）および図2（世代数/培養日数）のグラフで示す。

bFGFを添加しない従来の培養法（対照群）では、培養後10日（15世代前後）までは盛んに増殖するが、その後細胞の増殖は停止した。これに対し、本発明の培養法では、20日前後で幾らか増殖の速度の低下は見られるものの培養後30日（約30世代）以降でも増殖し続けることが示された。また、本発明の培養方法によって、培養後50日後で対照群の10⁵倍もの間葉系幹細胞が得られた（図1および2参照）。

実施例2 軟骨分化の誘導

実施例1で培養した間葉系幹細胞（培養後16日のbFGF添加群、対照群）を0.05%トリプシン+0.2mM EDTAで5分間処理して培養した間葉系幹細胞を単離した。次いで、 2.5×10^5 個の細胞を15ml試験管（ポリプロピレン製）に移し、1000×gで5分間遠心分離してFBSを含有するDMEM培地を除去した。分離した細胞に下記の組成の軟骨分化誘導培地を添加し、遠心管培養を行った。

軟骨分化誘導培地

高グルコース α MEM 培地10 ng/ml TGF β 1

100 nM デキサメタゾン

5 50 μ g/ml アスコルビン酸-2-リン酸100 μ g/ml ビルビン酸ナトリウムITS-プラス 6.25 μ g/ml トランスフェリン6.25 μ g/ml インスリン

6.25 ng/ml セレン酸

10 5.33 μ g/ml リノール酸

1.25 mg/ml ウシ血漿アルブミン

間葉系幹細胞を、上記培地中において 37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。培養開始から 24 時間後には、細胞は球状のペレットを形成した。2 日おきに培地を交換し、14 日間培養した。

培養前および培養後のペレットのプレパラートを調製し、トルイジンブルー染色を行った。その結果、bFGF 添加群では、細胞塊の形態および細胞外基質であるプロテオグリカンの染色性から、誘導前は未分化の状態であったが（図 3）、培養後では、軟骨組織が誘導されたことが示された（図 4）。一方、対照群では軟骨細胞は観察されなかった。また、軟骨分化誘導前の間葉系幹細胞の細胞形態は、bFGF 添加群では該幹細胞の形態が維持されていたが、対照群では繊維芽細胞様の細胞などが観察された。これらの結果を下記の表にまとめる。

表 1

	分化誘導前における 幹細胞の形態維持	軟骨分化誘導 軟骨分化 比率 (%)
bFGF 添加群	++	+++ 100
対照群	-	- 0

実施例 3 骨化の誘導

実施例 2 と同様に培養後 16 日の間葉系幹細胞（bFGF 添加群、対照群）を収集し、そして下記組成の骨分化誘導培地に移した。

5	<u>骨分化誘導培地</u>
	α MEM 培地
	10% FBS
	100 nM デキサメタゾン
	10 mM β グリセロールリン酸
10	<u>50 μg/ml アスコルビン酸-2-リン酸</u>

幹細胞を、上記培地中において 37℃、5% CO₂ 存在下にて培養した。2 日おきに培地を交換し、12 日間培養した。

培養後の細胞をアリザリンレッドで染色して観察したところ、bFGF 添加群では石灰化していることが示された。一方、対照群では石灰化は観察されるものの、そのレベルは bFGF 添加群と比較して顕著に低いものであった。これらの結果を下記の表にまとめる。

表 2

<u>骨分化誘導</u>	
bFGF 添加群	+++
対照群	+

実施例 4 種々の間葉系幹細胞の増殖における作用

実施例 1 と同様にしてウサギから腸骨および脛骨の骨髓由来の間葉系幹細胞を得た。また、ヒト脛骨骨髓由来の間葉系幹細胞は、BioWhittaker Inc.

(Walkersville, MD)から得た。ウサギ由来の間葉系幹細胞は 2×10^8 細胞個(赤血球を含む) / 10 cm^2 培養皿にて播種し、ヒト由来の間葉系幹細胞は 10^3 細胞個 / cm^2 で播種し、bFGFの存在下 (1 ng/ml) または不存在下にて培養した。継代はウサギ由来の間葉系幹細胞では 5×10^3 個 / cm^2 、ヒト由来の間葉系幹細胞では 10^3 個 / cm^2 で播種して行った。(実施例1を参照)。
各間葉系幹細胞について培養は独立的に2回実施した。得られた結果を図5に示す。

図5において、ウサギ腸骨(I)および脛骨由来(T)の間葉系幹細胞は共にbFGFにより増殖率が増加し、寿命の延長が観察された(AおよびBを参照)。ヒト脛骨由来の間葉系幹細胞では、ヒト血清含有培地(C)中において増殖率の増加および寿命の延長が観察された。

また、イヌ腸骨由来の間葉系幹細胞においても同様な結果が得られた(結果は示さない)。

実施例5 培養間葉系幹細胞の軟骨分化能の検証

1) 組織化学的分析

4週齢のウサギから採取した間葉系幹細胞をFGF (bFGF)の存在下 (FGF(+)) または不存在下 (FGF(-)) で増殖させ3回継代培養し、次いで実施例2にて用いた軟骨分化誘導培地に移して2、4、8日間培養し、トルイジンブルー染色を行った。その結果、bFGF軟骨分化誘導2日では未だ軟骨細胞の分化は観察されないが(図6-A)、4日ではペレットの表面に球状細胞(軟骨細胞)が観察された(図6-B)。8日ではFGF(+)の間葉系幹細胞の全てが球状になった(図6-C)。これに対し、FGF(-)の間葉系幹細胞では、FGF(+)の細胞と比較して軟骨分化が顕著に遅れていた(図6-D)。

また、3、6、9および12回継代したFGF(+)の間葉系幹細胞を同様に軟骨分化誘導培地に移して16日間培養し、トルイジンブルー染色を行った。その結果、3～9継代培養ではほとんど全ての細胞において間接様組織が観察された(図6-E～G)が、継代数が増加するにつれて、トルイジンブルー染色される軟骨プロテオグリカンの量も減少した。12継代培養では、一部の細胞のみが軟

骨細胞となっていた（図6-H）。

これらの結果から、FGFは間葉系幹細胞の軟骨分化を促進するが、当該分化能は継代するにつれて低下することが示される。

2) 生化学的およびマーカー遺伝子による分析

- 5 FGF(+)またはFGF(-)において3、6、9および12回継代した間葉系幹細胞について、グルコサミノグルカン含量およびアルカリホスファターゼ活性を測定すると共に、軟骨の分子マーカーであるII型コラーゲンおよびX型コラーゲンのmRNA量について分析した。

(1) 方法

- 10 グルコサミノグルカン含量は、BitterとMuir (*Anal. Biochem.* 4 (1962), 330-334)の方法に従って測定した。また、培養細胞中のアルカリホスファターゼ活性の測定は、Bessey等 (*J. Biol. Chem.* 164 (1946), 321-329)の方法に従って実施した。各mRNAは、下記のようにRT-PCRにより検出した。

RT-PCR

- 15 培養細胞からの全RNA抽出は、ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて実施した。次いで、第1ストランドcDNAは、SUPERScript II RNase H-逆転写酵素 (Life Technologies, Inc. Rockville, MD)を使用して全RNA 1 μ gから合成した。合成したcDNAを鋳型として、次のPCR条件: 94℃、30秒にて変性、そして65℃、1.5分間にてプライマー伸長を
20 25または30サイクルにてPCR増幅を実施し、得られたPCR産物を1%アガロースゲル電気泳動およびエチジンプロミド染色により検出した。なお、PCRには次のプライマーのセットを用いた。

プライマー

ウサギII型コラーゲン:

- 25 5'-CATACCGTAAGTGGGGCAAGACTG-3' (SEQ ID NO: 1) および
5'-TGCCAGTTCAGGTCTCTTA-3' (SEQ ID NO: 2)

ウサギX型コラーゲン:

5'-CCCAACACCAAGACACAGTT-3' (SEQ ID NO: 3) および

5' -ATCACCTTTGATGCCTGGCT-3' (SEQ ID NO: 4)

G A P D H :

5' -GTCAAGGCCGAGAATGGGAA-3' (SEQ ID NO: 5) および

5' -GCTTCACCACCTTCTTGATG-3' (SEQ ID NO: 6)

5

(2) 結果

軟骨基質であるグリコサミノグリカン含量は、F G F (+)およびF G F (-)の間葉系幹細胞培養物について、継代数の増加につれて減少した。しかし、F G F (+)の間葉系幹細胞培養物におけるグリコサミノグリカン含量は、F G F (-)のもの

10 のと比較して著しく多いものであった (図 7-A)。

同様に、アルカリホスファターゼ活性はF G F (+)およびF G F (-)培養物について、継代数の増加につれて減少したが、F G F (+)培養物におけるアルカリホスファターゼ活性は、F G F (-)のものと比較して著しく高レベルであった (図 7-B)。

15 また、軟骨細胞の分子マーカーである II 型コラーゲンおよびX型コラーゲンのmRNA量は、F G F (+)およびF G F (-)共に継代につれて減少していたが、II 型コラーゲンおよびX型コラーゲンのmRNA量は、F G F (+)の方がF G F (-)より高レベルであった (図 7-C)。

これらの結果から、F G Fがインビトロにおける間葉系幹細胞の軟骨分化能を

20 顕著に増強する共に継代による当該分化能の低下を抑制することが示された。

実施例 6 培養間葉系幹細胞の骨分化能の検証

F G F (+)またはF G F (-)にて継代培養した間葉系幹細胞の骨分化能を検証した。

(1) 方法

25 ヒト間葉系幹細胞を、高密度 (5 0 0 0 細胞個 / c m²) または低密度 (1 0 0 0 細胞個 / c m²) にて播種し、F G F 存在下または不存在下にて3、6および9回継代培養し、次いで実施例 3 に記載の骨誘導培地に移して培養した。これらの培養物において、カルシウム含量、アルカリホスファターゼ活性を測定する

と共に、骨芽細胞に特徴的な遺伝子である骨シアロプロテイン（B S P）、オステオポンチンおよびオステオカルシンのmRNA量について分析した。

細胞培養物中のアルカリホスファターゼ活性の測定は、実施例5と同様に実施した。カルシウム含量は、Gitelman (*Anal. Biochem.* 18 (1967), 521-531)の方法に従って測定した。

骨シアロプロテイン（B S P）、オステオポンチンおよびオステオカルシンのmRNA量は、下記のプライマーのセットを用いて実施例5に従ってR T-P C Rにより分析した。

プライマー

ヒト 骨シアロプロテイン（B S P）：

5'-CATTTTGGGAATGGCCTGTG-3' (SEQ ID NO: 7) および

5'-ATTGTCTCCTCCGCTGCTGC-3' (SEQ ID NO: 8)

ヒト オステオポンチン：

5'-CTAGGCATCACCTGTGCCATACC-3' (SEQ ID NO: 9) および

5'-CAGTGACCAGTTCATCAGATTCATC-3' (SEQ ID NO: 10)

ヒト オステオカルシン：

5'-CCACCGAGACACCATGAGAG-3' (SEQ ID NO: 11) および

5'-CCATAGGGCTGGGAGGTCAG-3' (SEQ ID NO: 12)

G A P D H：

5'-GTCAAGGCCGAGAATGGGAA-3' (SEQ ID NO: 5) および

5'-GCTTCACCACCTTCTTGATG-3' (SEQ ID NO: 6)

(2) 結果

細胞を高密度で播種した場合、細胞のカルシウム含量およびアルカリホスファターゼ活性は、継代数またはF G F (+) もしくはF G F (-) において顕著な差は観察されなかった（図8-A, C）。しかし、細胞を低密度で播種した場合、カルシウム含量は、F G F (+)の方がF G F (-)より高く、そして継代につれて減少していた（図8-B）。

また、骨シアロプロテイン (B S P)、オステオポンチンおよびオステオカルシンのmRNA量は、F G F (+)およびF G F (-)では3継代および6継代との間で顕著な変化は見られなかったが、9継代のF G F (-)間葉系幹細胞培養物ではこれらのmRNAレベルは減少していた (図8-D)。

- 5 これらの結果から、F G Fがインビトロにおける間葉系幹細胞の骨分化能の低下を抑制することが示された。

比較例 培養間葉系幹細胞の脂肪細胞分化能の検証

F G F (+)またはF G F (-)にて継代培養した間葉系幹細胞の脂肪細胞分化能を検証した。

- 10 F G F (+)またはF G F (-)にて4、6、9継代した細胞を下記の脂肪細胞誘導培地に移して25日間培養し、間葉系幹細胞を脂肪細胞に分化誘導した。

脂肪分化誘導培地

α MEM培地 (高グルコース)

- 15 10% F B S

1 μ M デキサメタゾン

0.2 mM 3-イソブチルー1-メチルーキサンチン

- 20 脂肪細胞への分化は、オイルレッド染色により、および脂肪細胞分化の分子マーカーであるP P A R-γ 2のmRNAをR T-P C Rにより分析することにより実施した。R T-P C Rは、下記のプライマーのセットを用いて実施例5に従って実施した。

プライマー

ヒトP P A R-γ 2 :

- 25 5'-CATTCTGGCCCACTT-3' (SEQ ID NO: 13) および

5'-CCTTGCATCCTTCACAAGCA-3' (SEQ ID NO: 14)

G A P D H :

5'-GTCAAGGCCGAGAATGGGAA-3' (SEQ ID NO: 5) および

5' -GCTTCACCACCTTCTTGATG-3' (SEQ ID NO: 6)

F G F (+)およびF G F (-)にて継代培養した間葉系幹細胞は、同様にオイルレッド染色された(図9-A, B)。また、脂肪細胞分化のマーカーであるP P A R- γ 2のmRNAにおいても9継代までほぼ同じレベルであった。

- 5 この結果から、F G Fの有無が間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化には影響しないことを示している。

産業上の利用可能性

- 従来の培養方法では15世代前後で細胞の増殖が停止していたものが、本発明
10 の培養方法によれば、間葉系幹細胞を30世代以上培養することが可能である。
さらに、従来の培養法と比較して細胞数にして約 $10^5 \sim 10^6$ 倍の細胞数を得ることができる。また、継代を重ねるごとに低下する多分化能の低下を抑制することが出来る。本発明により培養された間葉系幹細胞は、軟骨細胞、骨芽細胞への分化能を維持し、さらに寿命が延長されているため、軟骨組織または骨組織の移植
15 用に多量の軟骨細胞または骨細胞を供給することが可能となる。このことは、軟骨や骨の移植治療に極めて重要である。

図面の簡単な説明

- 図1は、F G F添加群における細胞増殖を[細胞数/培養日数]により示すグ
20 ラフである。

図2は、F G F添加群における細胞増殖を[世代数/培養日数]により示すグ
ラフである。

図3は、b F G F添加による軟骨分化誘導前の組織の顕微鏡写真である。

図4は、b F G F添加による軟骨分化誘導後の組織の顕微鏡写真である。

- 25 図5は、b F G F (1ng/ml) 存在下または不存在下におけるウサギ間葉系幹細胞(腸骨由来(I), 脛骨由来(T)細胞)(A, B)およびヒト間葉系幹細胞(C)の細胞増殖を示す図である。

図6は、F G Fによる間葉系幹細胞の軟骨分化能を示す図であり、F G Fの存

在下（A－C）または不存在下（D）にて培養した間葉系幹細胞の軟骨分化誘導 2 日（A）、4 日（B）および 8 日（C, D）の間葉系幹細胞のペレット、並びに FGF の存在下にて 3, 6, 9, 12 継代培養した細胞ペレットの顕微鏡写真である。

- 5 図 7 は、FGF(+)または FGF(-)において継代培養した間葉系幹細胞の軟骨分化能を示す図であり、軟骨誘導した間葉系幹細胞のグリコサミノグリカン含量（A）、アルカリホスファターゼ活性（B）および軟骨特異的遺伝子（II 型コラーゲン、X 型コラーゲン）の発現（C）を示す。

- 10 図 8 は、FGF(+)または FGF(-)において継代培養した間葉系幹細胞の骨分化能を示す図であり、高密度または低密度で播種した間葉系幹細胞のカルシウム含量（A, B）、アルカリホスファターゼ活性（C）および骨特異的遺伝子（骨シアロプロテイン（BSP）、オステオポンチン（OP）およびオステオカルシン（OC））の発現（D）を示す。

- 15 図 9 は、FGF(+)または FGF(-)において継代培養した間葉系幹細胞の脂肪細胞分化能を示す図であり、脂肪細胞への分化した FGF(+)細胞（A）、FGF(-)（B）細胞の顕微鏡写真、および脂肪細胞特異的遺伝子（PPAR- γ 2）の発現（C）を示す。

請求の範囲

1. 間葉系幹細胞の増殖能を刺激する物質を培地に添加することを特徴とする哺乳動物の間葉系幹細胞の培養方法。
- 5 2. 前記物質が繊維芽細胞増殖因子（F G F）である請求項 1 に記載の方法。
3. F G F を 0.04 ～ 10 ng/ml の濃度で培地中に添加する、請求項 2 に記載の方法。
4. F G F を 0.1 ～ 1 ng/ml の濃度で培地中に添加する、請求項 3 に記載の方法。
- 10 5. 間葉系幹細胞がヒト由来である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。
6. 請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法により得られた、多分化能を保持する間葉系幹細胞。
7. 軟骨細胞への多分化能を有する、請求項 6 に記載の間葉系幹細胞。
8. 間葉系幹細胞の増殖能刺激物質としての F G F の使用。
- 15 9. 15 世代以上の継代培養において多分化能を保持する間葉系幹細胞。
10. 16 日以上継代培養において多分化能を保持する間葉系幹細胞。

図 1

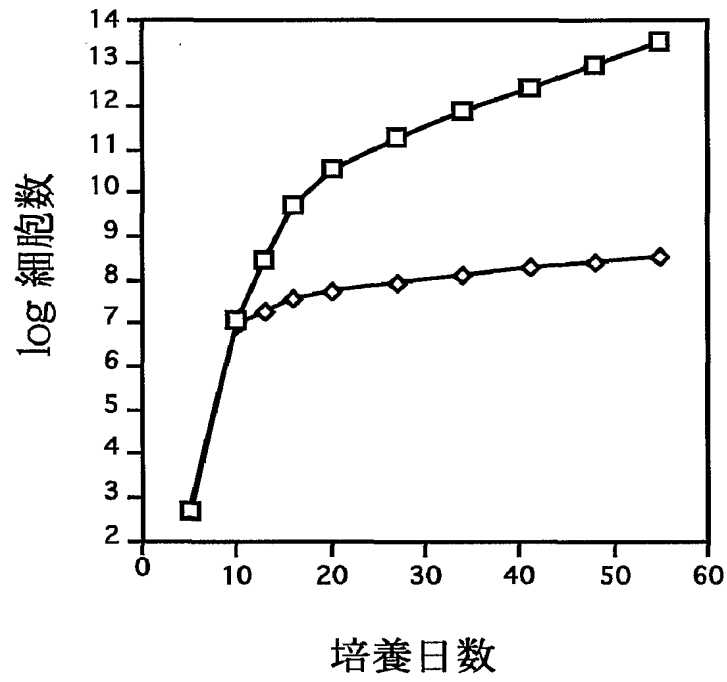
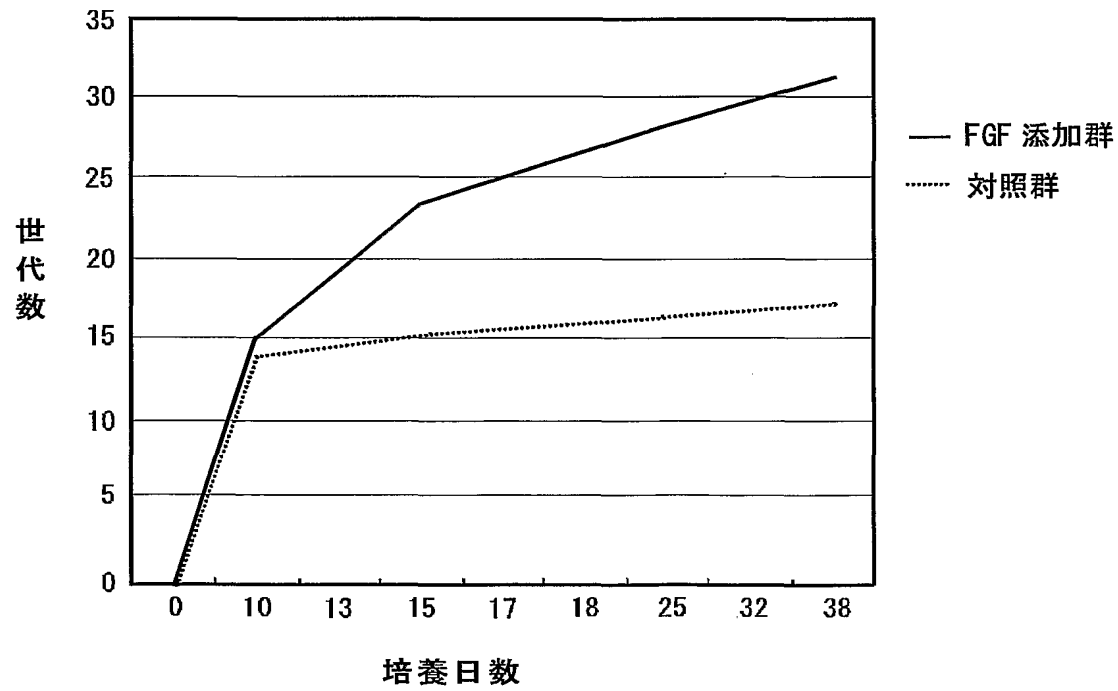


図 2



2/7

図 3

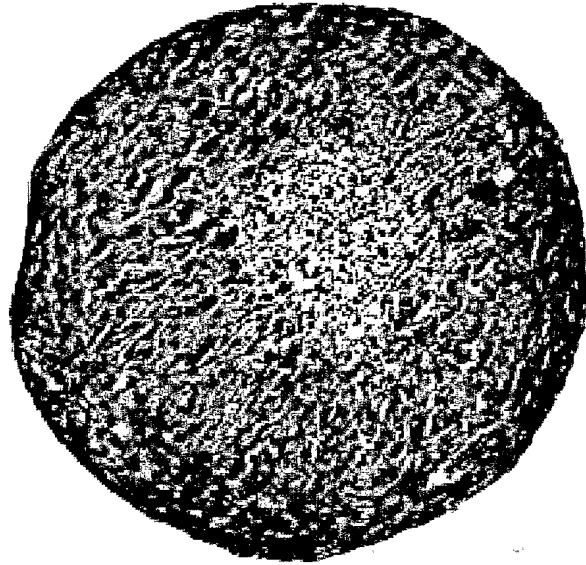


図 4

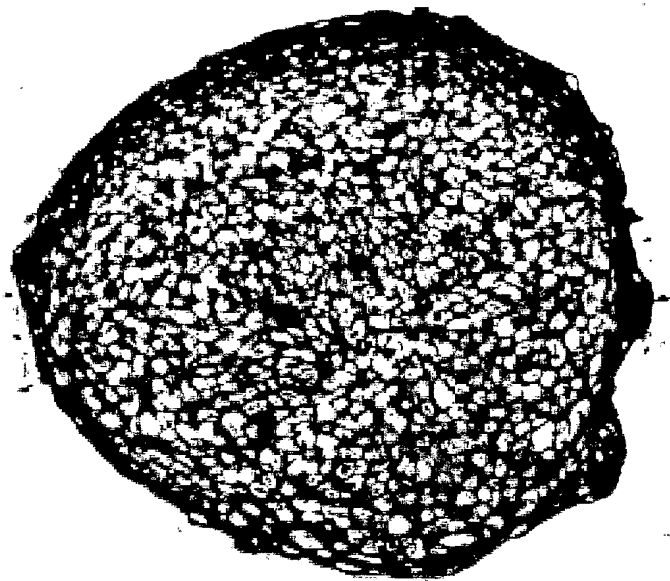


図 5

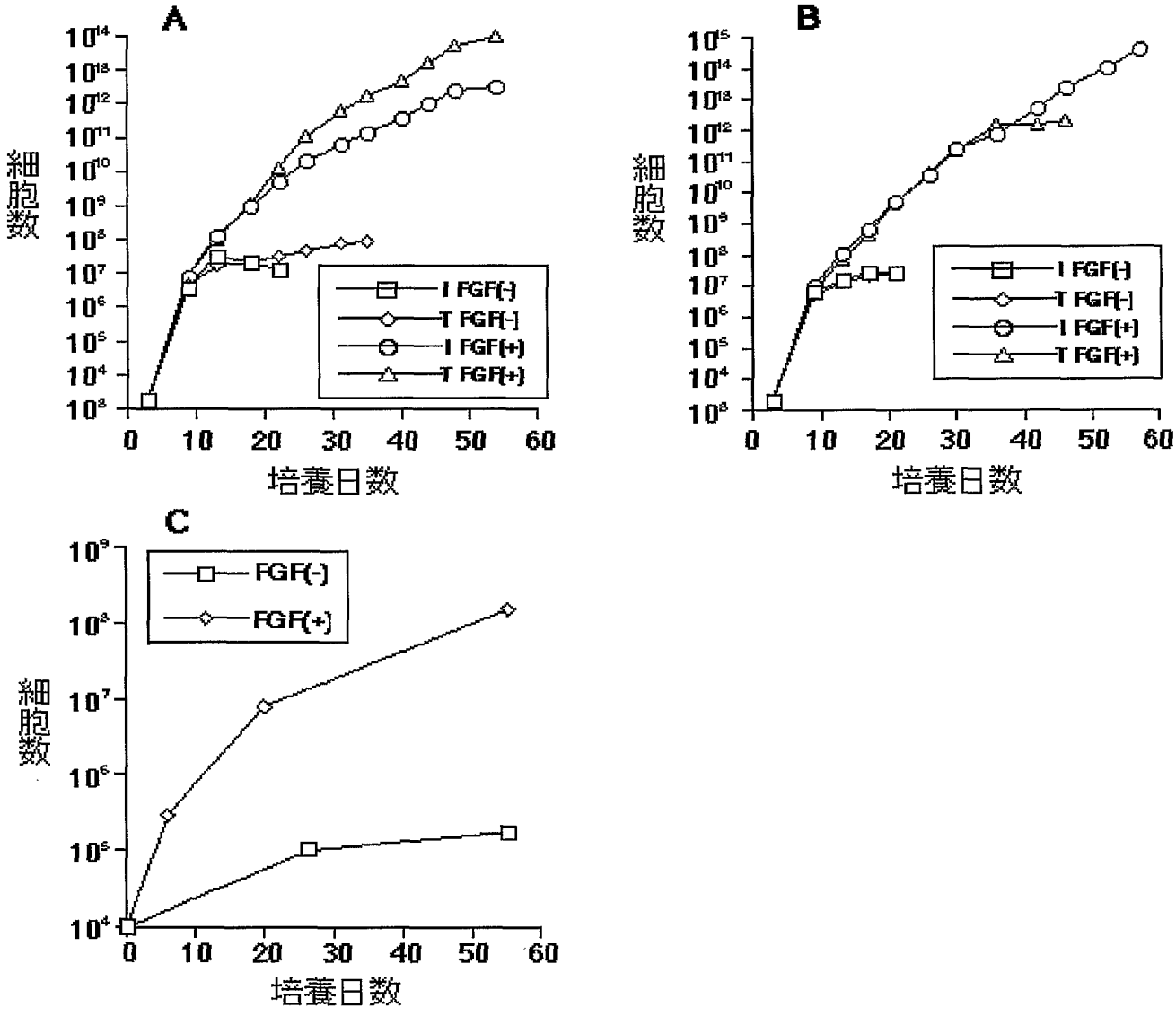


図 6

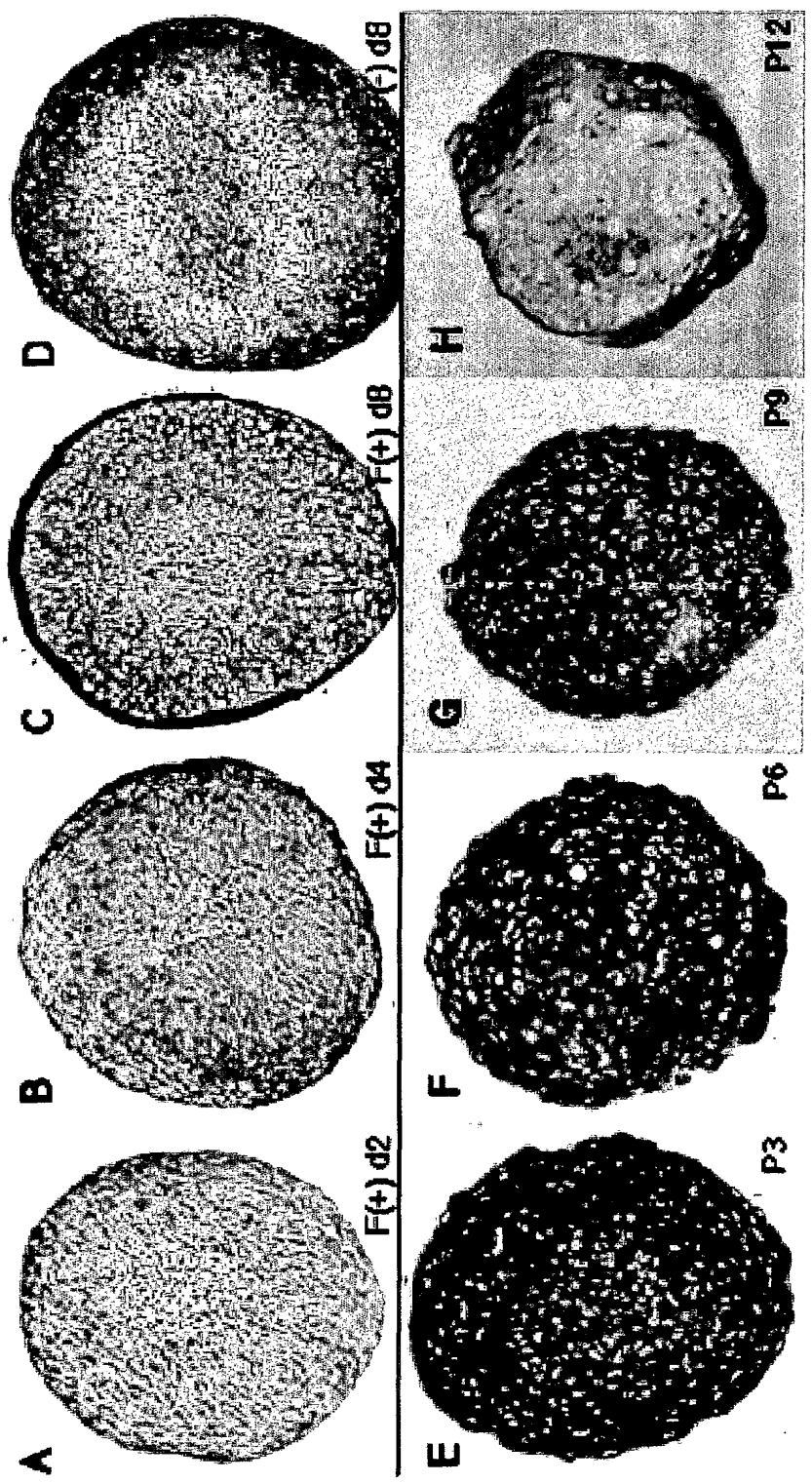


図 7

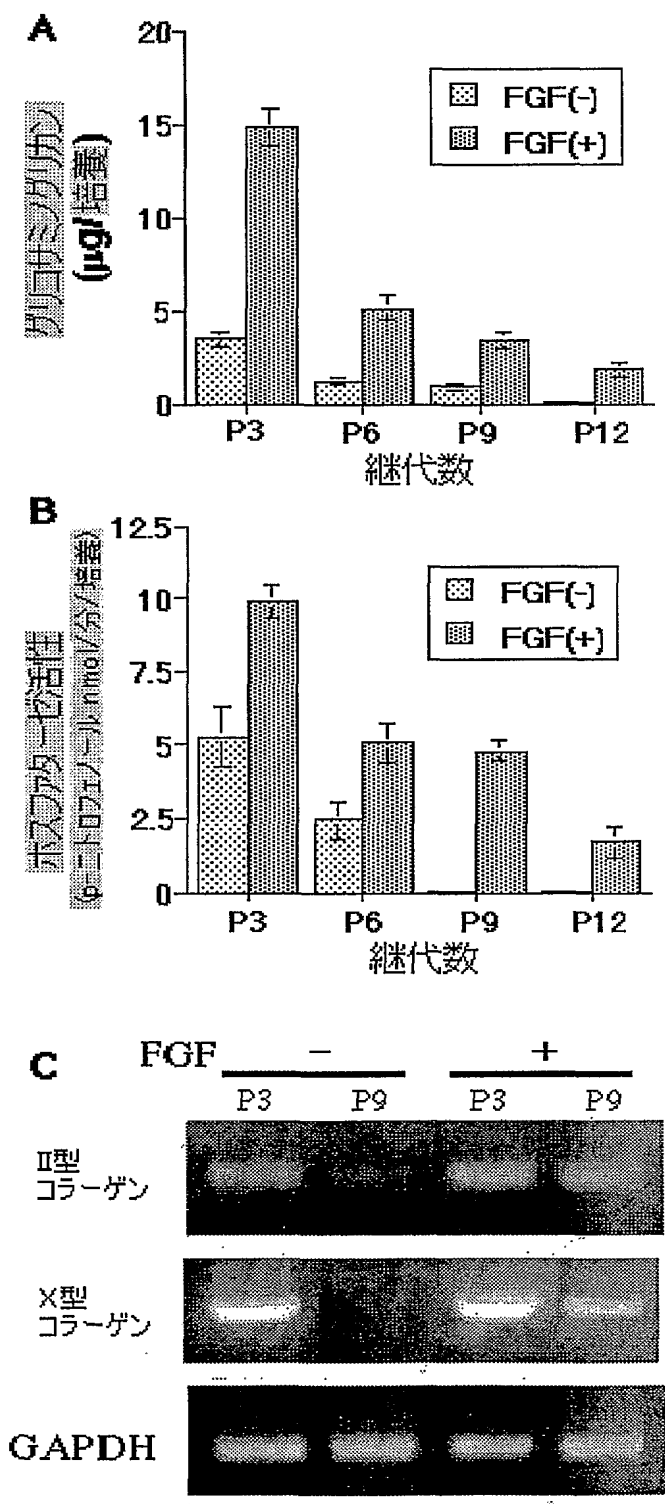
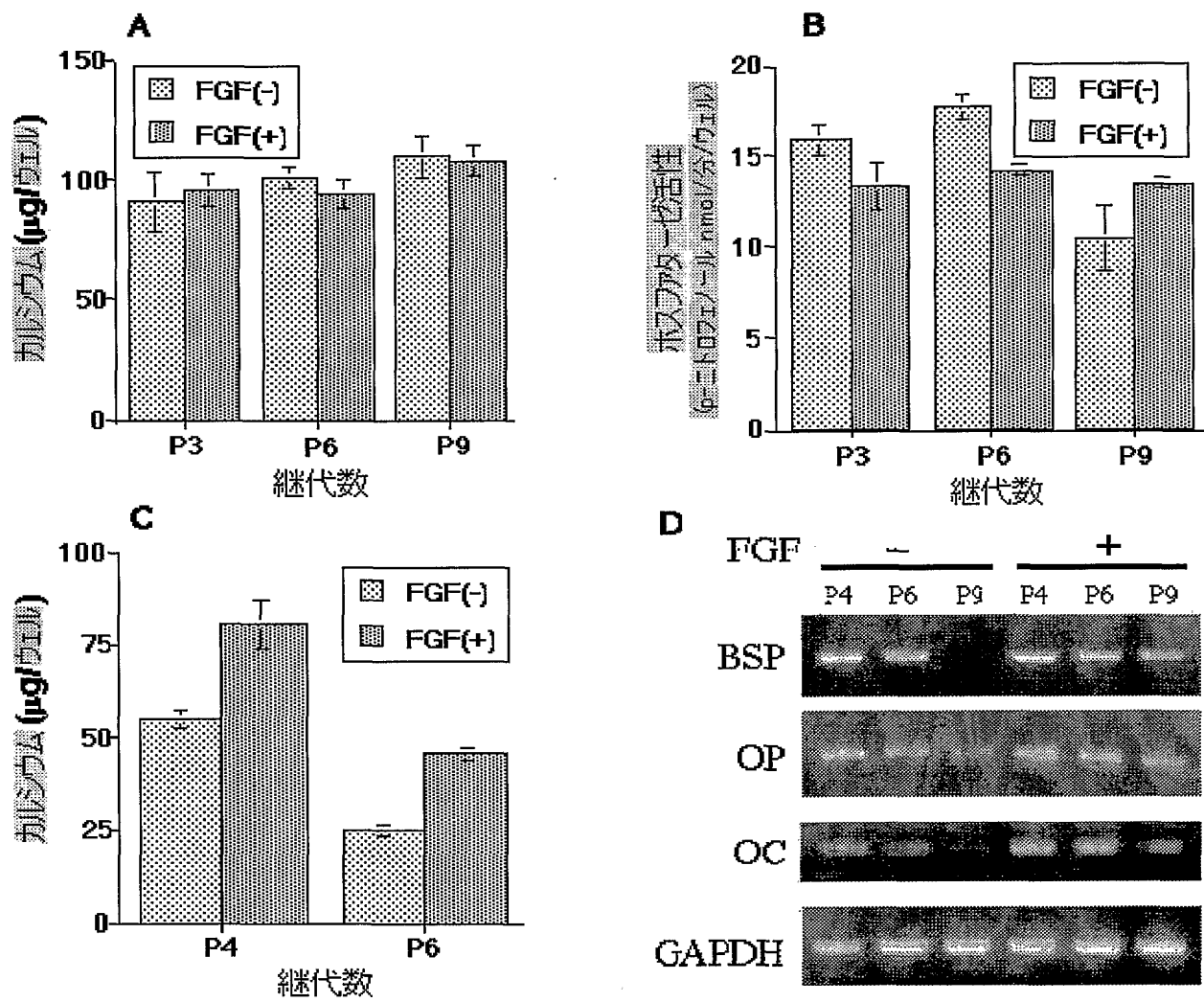


図 8



SEQUENCE LISTING

<110> KATO Yukio

<120> Method for culturing bone marrow mesenchymal stem cells

<130> FP1021

<141> 2001-09-12

<150> JP2000-276971

<151> 2000-09-12

<160> 14

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

cataccggta agtggggcaa gactg 25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

tgcccagttc aggtctctta 20

2/5

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

cccaacacca agacacagtt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

atcacctttg atgcctggct 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

gtcaaggccg agaatgggaa 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

gcttcaccac cttcttgatg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

cattttggga atggcctgtg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

attgtctcct ccgctgctgc 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

ctaggcatca cctgtgccat acc 23

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

cagtgaccag ttcattcagat tcattc 25

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

ccaccgagac accattgagag 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

ccatagggct gggaggtcag 20

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

cattctggcc caccaactt 19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

ccttgcatcc ttcacaagca 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07914

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N 5/06, 5/02 // (C12N 5/06, C12R 1:91), (C12N 5/02, C12R 1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N 5/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TSUTSUMI S. et al., "Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells during Proliferation in Response to FGF", Biochem. Biophys. Res. Commun., October, 2001, Vol.288, No.2, pages 413 to 419	1-10
X	IWASAKI M. et al., "Regulation of Proliferation and Osteochondrogenic Differentiation of Periosteum-Derived Cells by Transforming Growth Factor- β and Basic Fibroblast Growth Factor", J. Bone Joint Surg. Am., April, 1995, Vol.77, No.4, pages 543 to 554	1-10
X	QUARTO R. et al., "Modulation of Commitment, Proliferation and Differentiation of Chondrogenic Cells in Defined Culture Medium", Endocrinology, November, 1997, Vol.138, No.11, pages 4966 to 4976	1-10
A	PITTENGER M. F. et al., "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells", Science, April, 1999, Vol.284, No.2, pages 143 to 147	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
28 November, 2001 (28.11.01)Date of mailing of the international search report
25 December, 2001 (25.12.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07914

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KATO Y. et al., "Sulfated Proteoglycan Synthesis by Confluent Cultures of Rabbit Costal Chondrocytes Grown in the Presence of Fibroblast Growth Factor", J. Cell. Biol., February, 1985, Vol.100, No.2, pages 477 to 485	1-10
A	CA 2228084 A1 (MIYAJIMA, Atsushi), 06 April, 1999 (06.04.99), & JP 11-103856 A	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/06, 5/02// (C12N 5/06, C12R 1:91) (C12N 5/02, C12R 1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 5/00-5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	TSUTSUMI S. et al. Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells during Proliferation in Response to FGF. Biochem. Biophys. Res. Commun. Oct. 2001, Vol. 288, No. 2, p. 413-419	1-10
X	IWASAKI M. et al. Regulation of Proliferation and Osteochondrogenic Differentiation of Periosteum-Derived Cells by Transforming Growth Factor- β and Basic Fibroblast Growth Factor. J. Bone Joint Surg. Am. Apr. 1995, Vol. 77, No. 4, p. 543-554	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 11. 01

国際調査報告の発送日

25.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	QUARTO R. et al. Modulation of Commitment, Proliferation and Differentiation of Chondrogenic Cells in Defined Culture Medium. Endocrinology Nov. 1997, Vol. 138, No. 11, p. 4966-4976	1-10
A	PITTENGER M.F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science Apr. 1999, Vol. 284, No. 2, p. 143-147	1-10
A	KATO Y. et al. Sulfated Proteoglycan Synthesis by Confluent Cultures of Rabbit Costal Chondrocytes Grown in the Presence of Fibroblast Growth Factor. J. Cell. Biol. Feb. 1985, Vol. 100, No. 2, p. 477-485	1-10
A	CA 2228084 A1 (MIYAJIMA, Atsushi) 6. 4月. 1999 (06. 04. 99) & JP 11-103856 A	1-10